



INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(51) International Patent Classification 4 : A61K 49/00, 39/00, C07K 15/14 C12N 1/00		A1	(11) International Publication Number: WO 90/03801 (43) International Publication Date: 19 April 1990 (19.04.90)
(21) International Application Number: PCT/US89/04513		(81) Designated States: AT (European patent), AU, BE (European patent), CH (European patent), DE (European patent), FR (European patent), GB (European patent), IT (European patent), JP, LU (European patent), NL (European patent), SE (European patent).	
(22) International Filing Date: 11 October 1989 (11.10.89)			
(30) Priority data: 255,513 11 October 1988 (11.10.88) US Not furnished 4 October 1989 (04.10.89) US		(82) Designated States: Published <i>With international search report.</i>	
(71) Applicant: UNIVERSITY OF SOUTHERN CALIFORNIA [US/US]; 3716 Hope Street, 200, Los Angeles, CA 90007-4344 (US).			
(72) Inventors: EPSTEIN, Alan, L. ; 5128 Hillard Avenue, La Canada, CA 91011 (US). GLOVSKY, Michael, M. ; 750 Malcolm Avenue, Los Angeles, CA 90024 (US).			
(74) Agents: SIMPSON, Andrew, H. et al.; Knobbe, Martens, Olson and Bear, 620 Newport Center Drive, 16th Floor, Newport Beach, CA 92660 (US).			

(54) Title: VASOPERMEABILITY-ENHANCING CONJUGATES

(57) Abstract

Conjugates having a clinically useful delivery vehicle linked to a biologically active species which acts to increase vascular permeability and expand blood volume at or in proximity to the tumor site are disclosed. The vehicle-linked species may be, for example, a vasoactive agent, a substance that recruits or amplifies a vasoactive species, a toxin, a drug, an isotope, or a pharmaceutical compound. Suitable biological species comprises peptides, lipids, carbohydrates, or their derivatives. Chemical or recombinant DNA methods suitable for linking the species to the vehicles are indicated. A therapy is disclosed which comprises administering the vasoactive conjugate and delivering a diagnostic agent or a therapeutic agent at an optimal time thereafter, when tumor vasculature is maximally expanded.

BEST AVAILABLE COPY

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号

特表平6-503347

第3部門第2区分

(43)公表日 平成6年(1994)4月14日

(51)Int.Cl.⁹
A 61 K 47/48識別記号
Z 7433-4C

F I

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 9 頁)

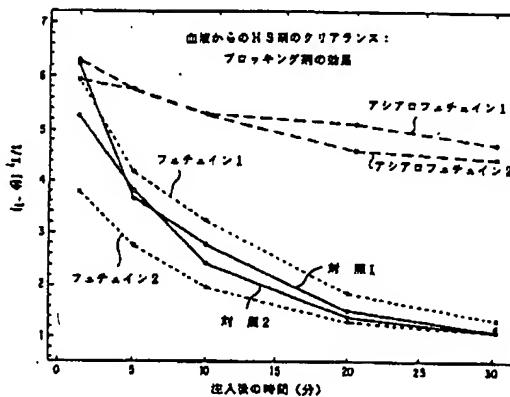
(21)出願番号 特願平4-503177
 (86) (22)出願日 平成3年(1991)12月13日
 (85)翻訳文提出日 平成5年(1993)6月21日
 (86)国際出願番号 PCT/US91/09368
 (87)国際公開番号 WO92/11037
 (87)国際公開日 平成4年(1992)7月9日
 (31)優先権主張番号 630,017
 (32)優先日 1990年12月19日
 (33)優先権主張国 米国(US)
 (81)指定国 E P (AT, BE, CH, DE,
 DK, ES, FR, GB, GR, IT, LU, MC, NL, SE), CA, JP, NO

(71)出願人 アドバンスド・マグネティクス・インク
 アメリカ合衆国、マサチューセッツ州
 02138、ケンブリッジ、ムーニー・ストリート 61
 (72)発明者 ジョセフソン、リー
 アメリカ合衆国、マサチューセッツ州
 02174、アーリントン、チャーチル・アベニュー 14
 (72)発明者 グロマン、アーネスト・ブイ
 アメリカ合衆国、マサチューセッツ州
 02135、ブルックリン、コロンビア・ストリート 80
 (74)代理人 弁理士 山崎 行造 (外2名)
 最終頁に続く

(54)【発明の名称】 多糖類を用いる治療薬のターゲティング

(57)【要約】

本発明は、治療薬と、細胞受容体と相互作用することができる多糖類との間に複合体を生成し、インターナリゼーション(RME)により得られた複合体を細胞内に取り込む、治療薬を特定の細胞集団にターゲティングする方法に関する。本発明の1つの態様において、鉄を含有する複合体と多糖類アラビノガラクタンの複合体を生成し、RMEにより鉄をとくに肝細胞にデリバリーするのに用いる。



特表平6-503347 (2)

請求の範囲

- (i) 治療薬と、細胞受容体と相互作用できる多糖類との複合体を生成する工程及び
(ii) その複合体をインターナリゼーションにより特定の細胞集団に取り込ませる工程を含む、特定の細胞集団に治療薬をターゲティングする方法。
- 分解又は修飾の前に、多糖類は、1,000 ダルトンより大きい分子量を有する、請求項1に記載の方法。
- 工程(i)が、
 - 第一の多糖類を得て、細胞受容体と相互作用できる第二の多糖類を構成する、第一の多糖類の修飾物質を生成する工程及び
 - 治療薬と第二の多糖類の複合体を生成する工程を含む、請求項1に記載の方法。
- 工程(a)において、第一の多糖類の修飾物質を生成する工程が、細胞受容体と相互作用することができる第二の多糖類を構成する、第一の多糖類の分解生成物を生成する工程を含む、請求項3に記載の方法。
- 多糖類が、アラビノガラクタン、マンナン及びフコイダンから成る群から選ばれる、請求項1に記載の方法。
- 治療薬が、鉄を含有する組成物を含み、多糖類がアラビノガラクタンである、請求項5に記載の方法。
- 治療薬がメトトレキセートを含み、多糖類がアラビ

ノガラクトンである、請求項5に記載の方法。

- 治療薬が葉酸を含み、多糖類がアラビノガラクタンである、請求項5に記載の方法。
- 治療薬がスボンゴアデノシン (Ara A) 鮑酸塩を含み、多糖類がアラビノガラクタンである、請求項5に記載の方法。
- 治療薬が6-α-メチルブレドニゾロンを含み、多糖類がアラビノガラクタンである、請求項5に記載の方法。
- 治療薬がトリフルオロチミジンを含み、多糖類がアラビノガラクタンである、請求項5に記載の方法。
- 治療薬がホルモンを含む、請求項1に記載の方法。
- ホルモンがコルチコステロイドである、請求項12に記載の方法。
- ホルモンが6-α-メチルブレドニゾロンである、請求項12に記載の方法。
- 治療薬が造伝子を含む、請求項1に記載の方法。
- 治療薬が酵素を含む、請求項1に記載の方法。
- 治療薬がビタミンを含む、請求項1に記載の方法。
- ビタミンが葉酸である、請求項1に記載の方法。
- 治療薬がリボソームを含む、請求項1に記載の方法。
- 多糖類がアラビノガラクタンである、請求項15に記載の方法。

明細書

多糖類を用いる治療薬のターゲティング

本発明の技術分野

本発明は、特異的な細胞集団、特に肝細胞に対して治療薬をターゲティングする方法に関する。

発明の背景

背景となる技術を振り返る前に、ある用語の意味を明確にすることが有用である。治療薬とは、受容個体のある生理機能を、有利な方法で変化させる目的で投与されるものである。治療薬は薬物、タンパク質、ホルモン、酵素、核酸、ペプチド、ステロイド、成長因子、酵素活性物質の修飾物質、受容体活性物質の修飾物質およびビタミンを含む。診断薬とは、生理的機能には影響せず、ある生理的機能を明らかにする目的で投与されるものである。診断薬はシンチグラフィーの為の放射性同位元素、X線またはコンピュータートモグラフィーの為の、高電子密度標識、および磁気共鳴画像の為の磁気標識を含む。

ターゲティング(targeting)とは、薬剤を修飾して、非経口投与の後に、ある特異的な種類または集団の細胞による取り込みが、未修飾の薬剤で得られる以上に増加することである。

インターナリゼーション(RME)とは、細胞外空間にある分子を、細胞表面の特異的な受容体に結合させて

細胞内に取り込む(internalize)作用である。RMEとして知られている方法を通して、血管内に注入(inject)された分子は、血管から排除(除去)される。

RMEによる取り込みは一般に、リガンド-受容体相互作用に特有である3つの一般的な性質、すなわち構造特異性、飽和性および競合を示す。構造特異性は、受容体が密に関連した構造を識別できる時、また、受容体に結合する部位の、結合の必要条件に合う構造を有する分子のみが細胞に取り込まれる場合に観察される。RMEに関与する受容体はしばしば、血液循環から糖タンパク質を細胞内に取り込む又は排除する能力によって発見される。飽和性は、RMEを経て細胞内に取り込まれる薬剤の速度が、その薬剤の濃度の増加と共に減少する場合に観察される。これは高い濃度に於いて受容体がリガンドによってほぼ完全に占領してきたか、もしくはリガンドで飽和されてきた結果生ずる。

競合は、薬剤の細胞内への取り込みの速度が、その薬剤に構造上の類似点を持っている付加的な薬剤の存在により減少する場合に観察される。付加した薬剤は、受容体の結合部位を競い、最初の薬剤の細胞内への取り込みの速度を減少させる。飽和性は、高濃度の単一のリガンドが限られた数の受容体部位を競う場合に結果として生じる。競合は、化学的に異なるリガンドが限られた数の受容体部位に結合する場合に結果として生ずる。

RMEによる物質の取り込みは、正常で健康な細胞の

特表平6-503347(3)

特徴である。RME輸送系は、正常な大食細胞、肝細胞、繊維芽細胞および網状赤血球に見出される。RMEは細胞に、アシアロ糖タンパク質、低密度リボタンパク質、トランスフェリンおよびインシュリンのような血漿中の種々の高分子物質の細胞内取り込みを可能にする。RMEを行なう細胞の一覧としては、RMEの一般的な説明も含んでいる Bilemanらによる、232 Biochem. J. (1985) pp. 1-14 の表Iを参照のこと。1989年8月3日出願の Menz, E. T. PCT国際公開 (WO) 90/01295 の表Iも参照のこと。正常細胞の腫瘍細胞への転換(形質転換)は、RMEを行なう受容体の活性の増加または減少と関連しているようである。肝細胞の、アシアロ糖タンパク質の受容体によって行なわれるRMEのような場合には、がん化した肝細胞への形質転換は、受容体の減少を伴う [Stockertらによる、40. Cancer Res. (1980) pp. 3632-3634]。多くの場合には、腫瘍抗原に対する薬剤の、抗体に基づくターゲティングのように、抗原は腫瘍細胞上では増加し、正常細胞上では減少する。

アラビノガラクトンのような、RMEに関与する受容体と相互作用をする多糖類は、RME型多糖類と呼ばれる。デキストラン、デキストリン、セルロース、ヒドロキシエチル澱粉、ヘパリン、デンプン、デキストラン硫酸、カルボキシメチル化デキストランおよびカルボキシメチルセルロースのような多くの通常の多糖類は、RMEに関与する受容体と相互作用をせず、それらは非

RME多糖類と呼ばれる。

これらの定義を手元に、関連のある背景となる技術について論ずる。非RME型多糖類は、診断および治療薬として使用される種々の物質の合成に用いられてきた [Jacobsen, T. による欧州特許明細書 0186847、Schroderによる米国特許第 4,501,726号、Banney, D. F. による PCT国際公開 (WO) 90/03190 (1989年9月28日出願)、Gronanによる米国特許第 4,827,945号、Gronanによる米国特許第 4,770,183号]。Banneyは、腫瘍細胞に向けられた複合体抗体を用いて、診断薬(磁気共鳴(MR)用コントラスト剤としての金属イオン)のデリバリーを示唆している。Banneyは、他の治療用複合体も、この方法を用いて、化学治療の効果の為、または放射線治療の増感もしくは増強を与える為にデリバリーされることを、詳しい実施例なしに示唆した [Banney, D. F., PCT国際公開 (WO) 90/03190 (1989年9月28日出願)、p. 51]。RME型多糖類であるアラビノガラクトンは、ある種の診断薬、特に超常磁性酸化鉄をターゲティングする為に使用できることが知られている [Menz, E. T. によるPCT国際公開 (WO) 90/01295 (1989年8月3日出願)]。

一方、治療薬は、一般的にリポソームおよび糖タンパク質によりターゲティングされてきた。一般的には注入の後、リポソームは微粒子状物質として認識され、食作用を受け、その結果、細胞内皮系(RES)組織中に濃

縮される。リポソーム内の物質はそこで、RESを含む肝臓、脾臓および骨のような組織中に濃縮される。表面を修飾したリポソームが合成されており、RMEによって排除され得るが、表面の修飾はタンパク質または糖タンパク質の被覆物から成る [Banade, V. V. による 29. J. Clin. Pharmacol. (1989) pp. 685-694、Dragstenらによる 926 Biochem. Biophys. Acta (1987) pp. 270-279.]。

大きさおよび組成を異にするコロイドおよび粒子はRESにより認識される。例えば、貧血の治療の為に用いられるデキストランで被覆したコロイド型酸水酸化鉄であるインフェロン (Inferon) は、RESの大食細胞の食作用活性により、血液からゆっくりと排除される [Hendersonらによる、34 Blood (1989) pp. 357-375]。テクニシウム硫酸 (technetium sulfur) コロイドのような放射性診断薬およびMR用コントラスト剤として用いられる多くの種類の磁性粒子もまたRESによって排除される。議論の為には、Josephsonらによる、8 Mag. Res. Imag. (1990) pp. 637-646参照のこと。

RMEにより細胞内に取り込まれる糖タンパク質は、治療薬をターゲティングする為に使われてきた。ターゲティング技術の説明としては、Weijerらによる、6 Pharr. Res. (1989) pp. 105-118の表IIを参照のこと。

発明の要約

本発明は、特定の細胞集団に、治療薬をターゲティング

する方法を提供する。ターゲティングは、治療薬と、インチーナリゼーション (RME) を行なう受容体と相互作用することのできる多糖類との間に、複合体を形成することにより達成される。結果として生じる複合体は、次いで、インチーカリゼーションにより特定の細胞集団に細胞内に取り込まれる。本発明は、治療薬が有益な作用を及ぼす組織では濃度が高くなり、認識されない毒性の影響を及ぼす組織では濃度が低くなることを可能にする。本発明の1つの態様においては、治療薬は、鉄およびアラビノガラクトンのような多糖類を含んでいる組成物を含む。この態様においては、アラビノガラクトンと鉄を含んでいる組成物との複合体を形成し、RMEにより、鉄を肝細胞へ特異的にデリバリーする為に使用する。

図の簡単な説明

本発明の前述の特徴は、添付した図に書かれている、以下の詳しい記述を参照することによって、より容易に理解される。

図1は、このデリバリーシステムのターゲティングの特異性を説明する為に、RME多糖類-治療薬複合体(本発明の態様による)のクリアランスに及ぼすアシアロフェュエインまたはフェュエインの効果を説明している図である。

特別な態様の詳細な説明

概略

本発明は、治療薬の、特定の細胞集団へのターゲティ

特表平6-503347 (4)

ングの方法を提供する。ターゲティングは、治療薬が何らかの有益な作用を及ぼす細胞集団に於いてはその薬剤の濃度を増大し、望まない毒性の効果を生じる他の細胞に於いてはその濃度を減少させる。多くの治療薬は、その薬剤が有益な作用を及ぼす細胞に対してではなく、有益な作用を引き受ける細胞以外の細胞に、有害な効果をもたらす。

治療薬を、ある細胞へ近づけ、他の細胞から遠ざけるターゲティングにより、本発明は、以前開発された治療薬の安全性および効力を高める方法を提供する。たとえば、肝臓の肝細胞の代謝を修正すべく開発された治療薬は、骨髄細胞には有害な影響を及ぼす。骨髄の機能は生命にとって絶対必要なものであるが故に、骨髄に及ぼす有害な影響は使用可能な薬剤の量を制限する。もしその薬剤を、アラビノガラクタンへの付着により肝細胞にターゲティングするなら、骨髄に対する濃度は減少する。通常は骨髄へ行く治療薬の小部分が、今度は肝臓に向かうので、その薬剤の有効性は改良される。骨髄に関連した副作用は除去されるはずである。

本発明に用いられたRME型多糖類の識別

本発明では、治療薬をRME型多糖類に結合させ、結果としてできた複合体を、細胞表面の受容体の作用を通して特定の種類の細胞にターゲティングする。ある種の多糖類のみを本発明に使用し、これらをRME型多糖類と呼ぶ。RME型多糖類は、たとえばデキストラン、デ

キストリン、セルロース、ヒドロキシエチル澱粉、ヘパリン、デンプン、デキストラン硫酸、カルボキシメチル化デキストランおよびカルボキシメチルセルロースのような一般の非RME型多糖類とは異なる。非RME型多糖類は、薬剤のデリバリーや薬物製剤、食品添加物として、また血漿の増量のような種々の運用に利用する。RME型多糖類はアラビノガラクタンおよびマンナンを含んでおり、本発明によれば、治療薬をそれぞれ直接に、肝細胞および大食細胞に及ぼす効果を用いて使用する。前述のBarneyのような、多糖類を用いたある種の治療薬の開発に関する文献は、RME型多糖類の使用については、開示もしくは関与していない。

以下、我々は本発明の複合体を、RME型多糖類-治療薬複合体と呼ぶ。RME型多糖類と治療薬との複合体は、治療薬のRME型多糖類への共有結合（実施例2および3）、多糖類で被覆したコロイド（実施例1）、またはRME型多糖類で被覆したリボソームを含む。

非RME型多糖類の、カルボキシルメチル化、スクシニル化、ヒドロキシエチル化および硫酸化を含む、化学的修飾が行なわれてきた。一般に、通常の多糖類の、かかる化学的修飾は、受容体に結合してRMEを受ける能力を与えない。

しかしながら、非RME型多糖類は、ある場合にはRMEを行なう受容体により認識される置換基の結合により修飾され、かかる修飾は、非RME型多糖類に

RME型多糖類の性質を与える。たとえば、ガラクトース残基を、非RME型多糖類であるデキストランに結合することができ、結果として生じた多糖類のガラクトースはアシアロ糖タンパク質受容体により認識されRMEを受ける。ガラクトースの結合により、デキストランはRME型多糖類に変えられる。同様に、マンノース基もデキストランに結合することができ、結果として生ずる多糖類は大食細胞のマンノース受容体により認識される。

RME型多糖類の第2の修飾は、部分的な消化を含み、より低分子量の多糖類を生じる。これは酸による開裂された加水分解と、分別法により行なうことができる、希望する大きさの部類のRME型多糖類を得ることができる。本発明の多糖類は、分解または修飾の前では、約1,000ダルトンより大きい分子量を有する。

多糖類を、RME型多糖類と呼ぶ為には、RMEを行なう受容体への多糖類の結合を示さなければならない。1つの証明の型は、RME型多糖類の、RMEによって排除されることが知られている糖タンパク質のクリアランスを妨げる能力を含む。たとえば、アラビノガラクタンとアシアロ糖タンパク質受容体との相互作用は、アラビノガラクタンが、アシアロ糖タンパク質であるアシアロフェュエインの放射性標本のクリアランスを妨げる能力により示された。ラットでは、500mg/kgのアラビノガラクタンが、¹²⁵I-アシアロフェュエインのクリアラ

ンスを妨げた [Josephsonらによる、8 Mag. Res. Inst. (1980) pp. 637-646 表1参照のこと]。他の実験と同様、この実験の結果として、アラビノガラクタンが肝細胞のアシアロ糖タンパク質受容体によって認識されることが結論される。従って、アラビノガラクタンはRME型多糖類である。

同様にマンナンは、放射性糖タンパク質であるリボヌクレアーゼBのクリアランスを妨げる [Brownらによる、188 Arch. Biochem. Biophys. (1978) pp. 418-428]。アラビノガラクタンおよびマンナンについては以下に簡単に論ずる。ここに明白に論じた多糖類に加えて、他のRME型多糖類も、論じた多糖類の修正或いは分解産物として生成することができる。

多糖類-治療薬複合体が、本発明に含まれる種類のものかどうかに関する簡単な検査は、種々の物質が、その複合体の血漿からの除去（クリアランス）を速らせる能力で説明することができる。本発明の複合体はRMEにより排除され、それらのクリアランスは、同じ受容体により排除される物質によって妨げられる。図1に見られるように、肝細胞上のRME受容体により排除されるアシアロフェュエインは、実施例1のアラビノガラクタン酸化鉄コロイドのクリアランスを妨げる。アシアロフェュエインは、RMEを行なう受容体と相互作用をしない他の多くのコロイドまたは表面を被覆した粒子のクリアランスを妨げないであろう。

特表平6-503347 (5)

本発明の、RME型多糖類-治療薬複合体のクリアランスは、たとえばデキストランおよびヒドロキシエチル澱粉のような非RME型多糖類の実質的な濃度の注入によっても影響を受けない。本発明のRME型多糖類-治療薬のクリアランスはまた、RESの大食細胞によって排除される、粒子、コロイドまたはリボソームの実質的な濃度の注入によっても影響を受けない。

治療薬をデリバリーする担体としての多糖類の利点

治療薬のデリバリーに、タンパク質のかわりに多糖類を用いることの利点は、多糖類が高温、極端なpH、または有機溶媒中において簡単には変性しないことである。実施例1において、多糖類、アラビノガラクタンを酸化鉄コロイドの被覆剤として用いている。その合成過程において、アラビノガラクタンはまず、可溶性の鉄の塩が存在している間は、およそ3より低いpHにさらされ、次いで塩基の添加以後は高いpHにさらされ、最後に高温にさらされる。多糖類の安定性から、有機溶媒中で治療薬と多糖類との間に、共有結合ができたと考えられる。このことは、いくつかの治療薬が、低い水溶性を有するので、かなりの利点である。非水溶性の媒質中で作用する多糖類の、これに関連した利点は、エステルのような水に不安定な結合を治療薬と多糖類との間に作ることができることである。かかる化学作用の例は実施例3に供されている。

多糖類のもう一つの利点は、それらが微生物もしくは

植物材料から得られることである。ヒトまたは動物材料からの多糖類は、それが存在しないことを確かめるのに費用のかかる、病原性を含んでいる可能性がある。微生物または植物材料からの多糖類は、本発明に用いる為に、毒性および免疫原性の非常に低いものを選ぶことができる。植物または微生物材料は、粗多糖類標本を、大量に、信頼できる方法で、手ごろな価格で提供することができる。本発明に使用できる2種類の炭水化物は、アラビノガラクタンおよびマンナンである。

アラビノガラクタン

アラビノガラクタンは、多くの種類の木および植物の細胞壁から得られる、多糖類の一種である。アラビノガラクタンの一般的な材料は、アメリカ西部のカラマツ〔カラマツ属 オクシデンタリス (*Larix occidentalis*)〕である。この材料からのアラビノガラクタンは、食品の結合剤、乳化剤または安定剤として使用される。それはアラビノースおよびガラクトースの分枝鎖のある、ガラクトースの主鎖から成る。一般に、ガラクトース対アラビノースの比は5:1から10:1の間である。分子量は10から100キロダルトンの間である [Glickman編、"Food Hydrocolloids", CRC Press (1982) pp. 5, 38]。

最も良い結果は、精製したアラビノガラクタンを用いた場合に得られる。市販のアラビノガラクタンを、限外濾過によりさらに精製し、100,000ダルトンより大きな

不純物および10,000ダルトンより小さな不純物を取り去ることができる。この方法により精製したアラビノガラクタンを本発明の実施例に用いた。実施例1～3で用いたアラビノガラクタンはこの方法で精製したものである。

アラビノガラクタンは、肝細胞のアシロ糖タンパク質受容体に結合する。この受容体は種々の物質でRMEを行なう [Harfordらによる、Vol. IV "The Glycoconjugates", M. I. Horowitz編、Academic Press (1982) pp. 27-55]。アラビノガラクタンに結合した治療薬は、肝細胞を標的とする。

マンナン

マンナンは、酵母菌の細胞壁から得られる多糖類の一種である。それらは主に、種々の直鎖および分枝鎖構造のある α -D-マンノピランである [Corinらによる、Vol. 2 "The Polysaccharides", G. D. Aspinall編、Academic Press (1983) pp. 376-380]。

マンナンはRESの大食細胞上に見出されるマンノース受容体に結合する。マンナンに結合した治療薬は、大食細胞をターゲットとする。

本発明によりターゲティングされた治療薬

本発明の方法を用いることにより、広範な種類の治療薬を、ある細胞集団にターゲティングすることができる。かかる治療薬の例を表1にまとめた。表1のある薬剤は、肝炎の治療の為の抗ウイルス剤のように、肝細胞にターゲティングされる。鉄は、栄養失調、すなわち鉄欠乏症

貧血を治療する為に、肝細胞にターゲティングされる。肝臓酵素の欠乏のような、遺伝的欠損が肝臓に発現されている場合、DNAは肝臓にターゲティングされ、その遺伝的欠損を変える。本発明は、別の技法によりターゲティングしてきた治療薬をターゲティングする為に使用することができる。ターゲティングが試みられてきた治療薬の、別の一覧がある [Meijerらによる、6 Pharm. Res. (1989) pp. 105-118 表II および Bande, 29 J. Clin. Pharmacol. (1989) pp. 685-694 参照]。

表1 本発明によりターゲティングされる薬剤および適用

薬剤	適用	参考
鉄	貧血の治療	実施例1
Ara A-リン酸塩	肝炎の治療	Bodmerらによる 112 Methods in Enzymology (1985) pp. 298-306
トリフルオロチミジン	肝炎の治療	同上
DNA	遺伝的欠陥の取り消し	Wuらによる、262 J. Biol. Chem. (1988) pp. 14621-14624
メトトレキセート	リーシュマニア症の治療	Mukhopadhyayらによる、244 Sci. (1989) pp. 705-707

特表平6-503347 (6)

B型肝炎ウイルスに慢性的に感染している個体の肝細胞に対する抗ウイルス剤のターゲティングは、抗ウイルス剤が、ターゲティングされる治療薬であるという点で本発明の適用の1つである。抗ウイルス剤を、感染した細胞集団（肝細胞）にターゲティングし、骨髓から遠ざけることは、結果として薬物による、より効果的な治療を生じるであろう。抗ウイルス物質をアラビノガラクタンに結合し、静脈内に注射して、肝細胞中の濃度を高めることができる。鉄のような、栄養的に必要とされる物質のターゲティングは本発明によって行なうことができる。実施例1においては、本発明の教示に従って、RMEにより鉄をターゲットに向けるアラビノガラクタンコロイドを合成する。非経口的に投与した鉄はインフェロン（Inferon）と呼ばれる、酸化鉄デキストラン複合体の形で、しばしば貧血の治療に用いてきた。酸化鉄デキストランは、RESにより血液から徐々に排除される。Inferonは、不利な反応を引き起こす傾向を示す[Baaststraらによる、243 JAMA (1980) pp. 1726-1731]。対照的に、アラビノガラクタンとともに作った酸化鉄（実施例1参照）は、RMEによりすみやかに排除され、肝臓の肝細胞にターゲティングされる。薬物動態学および生体内分布におけるこの差異は、本発明の鉄が、酸化鉄デキストランよりも安全な治療薬であるということに帰着するであろう。

ビタミンも本発明によりターゲットに向けることができる

きる。実施例2は、葉酸-アラビノガラクタン複合体の開発を示しており、それはRMEによりビタミンである葉酸を肝細胞にターゲティングする。葉酸は薬物であるメトトレキセートと化学的には類似しており、メトトレキセートは、葉酸用に示された方法をわずかに変更することによりアラビノガラクタンに結合することができる。

ステロイドのようなホルモンは、本発明の方法を利用することにより、特異的な細胞集団へ、直接デリバリーすることができる。ステロイドは、強い生物活性を有し、それはステロイドが細胞上の受容体に結合した後に働く[Martin, C. R.、"Textbook of Endocrine Physiology", Williams & Wilkins (1976) p. 21参照]。ステロイドの、細胞へのターゲティングは、本発明の広範囲に有用な適用の1つである。ホルモンのターゲティングの1つの適用は、グルココルチコイドであるステロイドの、細胞へのターゲティングを含む。実施例3はアラビノガラクタン-プレドニゾン結合体の合成を示しており、その結合体は、ステロイドであるプレドニゾンをRMEにより肝細胞へターゲティングするのに役立つ。ステロイドはマンナンへの結合によってもターゲティングすることができ、RESの細胞上に存在するマンノース受容体によって、適切な細胞内へターゲティングされる。

実施例

実施例1

アラビノガラクタンで被覆したコロイド酸化鉄を、鉄欠乏症の治療用に調製した。国際公開(PO) 90/01295の実施例6.10.1と同様、アラビノガラクタンで被覆した超常磁性（または常磁性）酸化鉄を調製した。 $FeCl_3$ (15.8g、58.5mol) および $FeCl_2$: Fe_2O_3 (6.24g、31.6mol) の水溶液を調製し、0.22μのフィルターで通過し、大きな鉄片を除去した。等量の、鉄塩と、カラマツ材由来のアラビノガラクタン (60g、Sigma Chemical Co.) を蒸留水120mLに溶かした水溶液とを合わせ、周囲温度で激しく攪拌した。この混合物に水酸化アンモニウムの30%水溶液を、pHが約10になるまでゆっくり滴下した。次に混合物を約90~100°Cでおよそ15分間加熱した。混合物を冷却し、フィルターの多孔度を0.80、0.45、0.22μと小さくしながら通過した。

次いで300キロダルトンで分離(cut off)する、2Lの中空糸ユニット(Amicon, Inc.、Danvers、マサチューセッツ州)を用いた畳外透過処理により、過剰のアラビノガラクタンを除去する。前述の処理で得た過剰物を畳外透過ユニットに装填し、25mMクエン酸ナトリウム緩衝液(pH 8.5)を加えて洗浄する。洗浄は5回繰り返すか、または澄んだ溶離液が観測されるまで洗浄する。洗浄した底物を濃縮し、多糖類と金属溶液を合わせたものと体積にもどす。

多糖類であるアラビノガラクタンを、鉄コロイドの被覆剤として使用している為、それは肝細胞のアシクロ

タンパク質受容体によって排除される。注入した鉄が肝臓に存在し、脾臓には存在しないことは、特異的細胞集団（肝細胞）への鉄のターゲティングが行なわれたことを示している。データは、Josephsonらによる、8 Mag. Res. Imag. (1990) pp. 637-646の表2、またはMenzらによるPCT国際公開(PO) 90/01295、表Vを参照のこと。

アラビノガラクタンで被覆した酸化鉄の、治療のボトルシヤルは、合成に⁵⁵Feを用いた場合に示すことができる。鉄はヘモグロビン中に検出される鉄のように、正常な生体の鉄のプールに、寿命中取り込まれている。従って、アラビノガラクタン型の酸化鉄は、鉄欠乏性貧血の処置に用いた場合に治療薬となり得る。

実施例2

葉酸は、ビタミンの一種で、以下に述べるように、アラビノガラクタンと呼ばれるRMEを受ける多糖類に結合されてきた。メトトレキセートという薬物は、葉酸の結合抗体であり、抗がん剤である。メトトレキセートは、以下に示す葉酸のカップリング化学作用の修正により、RMEを受ける多糖類に結合させ、薬物デリバリーに用いることができる。

葉酸二水和物 (6.0g、13μmol) を Fe_2O_3 (1g) に懸濁する。NaOH (0.01N、7滴) を、白い固体の葉酸が、ほぼ完全に溶けるまで加える。精製したアラビノガラクタン (23.000ダルトン、35.3mg、1.53μmol) を加

え、次いで1-(3-ジメチルアミノプロピル)-3-エチルカルボジイミド(51.2mg、288 μmol)を加える。室温で2.5時間攪拌した後、反応混合物をSephadex G-25カラム(9.5 \times 300mm)で0.05% NaH₃(0.33mL/分)を溶離剤として用いたHPLCにより分析した。遊離の葉酸および結合した葉酸の検出は、280nmにセットしたUV検出器を用いて行なった(葉酸のUV maxは280nmであり、logは4.40である)。クロマトグラムは、保持時間16.8分のところにアラビノガラクタンに結合した葉酸塩によるピークを示した。遊離の葉酸は35分に現われた。これらの割り当ては、アラビノガラクタンおよび葉酸をクロマトグラフィにかけて得たものである。精製したアラビノガラクタンは、280nmでは吸収しない為、屈折率測定器を必要とする。UV検出によれば、37%の葉酸がアラビノガラクタンに結合した。アラビノガラクタンの純度がなく、37%の葉酸塩が結合したことから、葉酸/アラビノガラクタン比3:1を得た。

実施例3

ステロイドは、RMEを受ける多糖類に結合することによって細胞にデリバリーすることのできる薬物の一類である。いろいろなステロイドを、以下に述べるものと類似の化学作用に従って、それらの多糖類に結合させることができる。一般的な工程は、(i)DTPAとの反応による、カルボキシル基を提供する多糖類結合体の調製と、(ii)ステロイドの、DTPA-多糖類のカルボキシル基を介

する結合である。

アラビノガラクタン-DTPAの調製

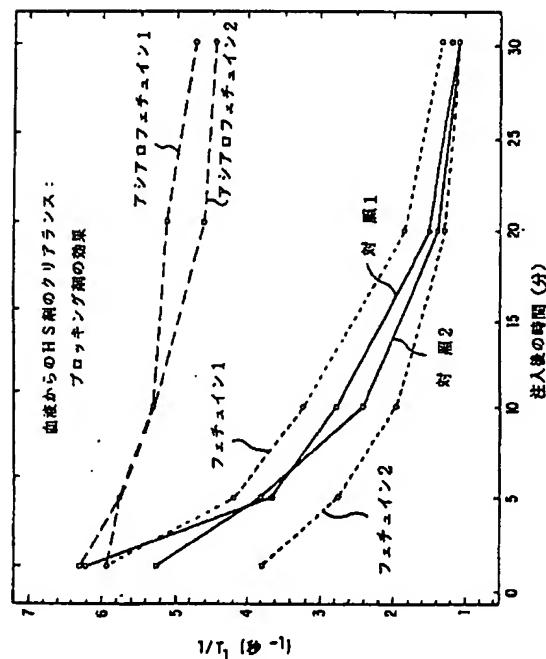
精製したアラビノガラクタン(23.000ダルトン、0.50g、21.7 μmol)およびジエチレントリアミンベンタ酢酸(DTPA)、ジアンヒドリド(0.102g、285 μmol)を、DMSO(20mL)に、60°Cで溶解した。1時間後、混んだ溶液を室温に冷やした。H₂O(10mL)の添加により、白い沈殿を生じた。混合物をAsicon YM-5 溶出液(分離5,000ダルトン)で通過し、H₂O(4 \times 30mL)で洗った。膜の上に残った生成物をH₂O(10mL)に溶かし、凍結乾燥した。白い粉末の収量は0.44gであった。加えたDTPA(呼称の式量は28,000ダルトン)のすべてが結合したとすれば、呼称のDTPA/アラビノガラクタン比は13:1であった。

6- α -メチルブレドニゾロンのアラビノガラクタン-DTPAへのカップリング

アラビノガラクタン-DTPA(107.5mg、3.8 μmol)と、6- α -メチルブレドニゾロン(84.5mg 172 μmol)を、DMSO(15mL)に60°Cで溶かした。1-(3-ジメチルアミノプロピル)-3-エチルカルボジイミド(259mg、1.45 μmol)を加え、反応混合物を60°Cで1時間攪拌した。反応液のHPLC分析(9.5 \times 300mmのセファデックスG-10カラム、溶離剤は0.05% NaH₃、0.50mL/分、280nm UV検出器)は、アラビノガラクタン-DTPA結合体の移動度に相当する、保持時間10.5分のところに單一

のピークを示した。19.5分のところには、6- α -メチルブレドニゾロンのピークはなく、アラビノガラクタン-DTPA結合体へのステロイドの結合(エスチル化による)が完全であったことを示している。H₂O(10mL)を加えた後、反応混合物をAsicon YM-3(分離3,000ダルトン)を用いて限外濾過し、H₂O(3 \times 30mL)で洗浄した。滤液には未反応のステロイド、カルボジイミド、DTPAの痕跡および他の低分子量物質が含まれていた。滤液のHPLC分析により、遊離のステロイドがないことを確認した。保持されていた物質はH₂O(10mL)を加え、生成物を凍結乾燥した。オフホワイトの粉末の収量は0.10gであった。

FIG. 1



特表平6-503347 (8)

International Conference on 5G and AI 2023

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		Information Pursuant to Article 17(3) EPC	
Assigning of International Patent Classification (IPC) to the International Application and IPC		International Application No. PCT/US 91/09358	
Int.C1.5		A 61 K 47/48	
II. FIELDS SEARCHED			
National Documentation Searched*			
Classification System		Classification Results	
Int.C1.5		A 61 K	
Documentation Inspected other than National Documentation or in Cases that some Documents are Inspected in the Photo Searcher			
III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT*			
Category	Character of Document, ** with indication where appropriate of the relevant passage(s)	Reference to Chapter No.†	
Y	WO,A,9001295 (ADVANCED MAGNETICS INC.) 22 February 1990, see page 8, line 31 - page 25, line 32 (cited in the application)	1-9,11, 15-20	
Y	Magnetic Resonance Imaging, vol. 6, no. 5, 1990, (Elsevier, New York), L. JOSEPHSON et al.: "A functionalized superparamagnetic iron oxide colloid as a receptor directed MR contrast agent", pages 537-546; see whole article, and in particular page 544, last paragraph - page 545, paragraph 1 (cited in the application)	1-9,11, 15-20	
Y	J. American medical Association, vol. 263, no. 17, 3 March 1990 (Elsevier, New York), R.D. VANZTRA et al.: "Intravenous contrast in clinical medicine", pages 1726-1731, see page 1726, abstract (cited in the application) /-	1-6	
<p>* Search information of cited documents. ** ** Document defining the general content of the art related to or considered to be of particular relevance. *** Document containing the specific disclosure of the invention. **** Document containing the specific disclosure of an invention claimed in the International Application or in a later International Patent Application. ***** Document containing the specific disclosure of an invention claimed in a later International Patent Application. **** Document containing the specific disclosure of an invention claimed in a later International Patent Application, established as prior art under Article 54(2) of the Convention, and which is not covered by the International Patent Application. ***** Document containing the specific disclosure of an invention claimed in a later International Patent Application, established as prior art under Article 54(2) of the Convention, and which is not covered by the International Patent Application. </p>			
<p>**** Document published after the International filing date or priority year and not in conflict with the application but considered to be of particular relevance. ***** Document published before the International filing date or priority year and not in conflict with the application but considered to be of particular relevance. **** Document containing the specific disclosure of an invention claimed in a later International Patent Application, established as prior art under Article 54(2) of the Convention, and which is not covered by the International Patent Application. ***** Document containing the specific disclosure of an invention claimed in a later International Patent Application, established as prior art under Article 54(2) of the Convention, and which is not covered by the International Patent Application. </p>			
IV. CERTIFICATION			
Date of the Actual Completion of the International Search		Date of Filing of this International Search Report	
16-04-1992		8 3 JUN 1992	
International Searching Authority			
Signature of International Searching Authority			
Mme N. KUIPER			

B. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE ELEVANT		(CONTINUED FROM THE SECOND SHEET)	
Citation of Document, with indication, when appropriate, of the relevant paragraph		Reference to Claim No.	
Y	Science, vol. 244, 12 May 1989, (Washington, DC, US), A. MUKOPADHYAY et al.: "Receptor-mediated drug delivery to macrophages in chemotherapy of Leishmaniasis", pages 705-707, see page 705, abstract (cited in the application)	1-5,7	
Y	Pharmaceutical Research, vol. 6, no. 8, 1989, (Saugetts, DE), D.K.F. MCILROY et al.: "Covalent and noncovalent protein binding of drugs: implications for hepatic clearance, storage, and cell-specific drug delivery", pages 109-110, see page 108, abstract; page 110, table II (cited in the application)	1-5,8,9 17,18 18,20	
Y	The Journal of Biological Chemistry, vol. 263, no. 29, 20 October 1988 (Baltimore, MD, US), Y. WU et al.: "Receptor-mediated drug delivery and expression in vivo", pages 14621-14624, see page 14621, abstract (cited in the application)	1-5,15, 20	
Y	Carbohydrate Research, vol. 118, 1983, (Amsterdam, NL), M.M. PONPIKUL et al.: "Synthesis of 6-(5'-cholest-3-ene-20-oxyl)hexyl 4-O-(D-deoxy-beta-D-galactopyranosyl)-1-thio-beta-D-glucopyranoside and derivatives thereof for in vivo liposome studies", pages 47-58, see page 47, paragraph 1	1-5,19.	
Y	Biochemistry International, vol. 10, no. 3, March 1985, (North Ryde, AU), P. DASGUPTA et al.: "Receptor-mediated uptake of astagaloside liposomes: Subcellular distribution on the liposomal marker in isolated liver cell types", pages 327-334, see page 327, summary	1-5,19	
Y	Proc. Indian. Natn. Sci. Acad., vol. 48, supplement no. 1, 1982, (New Delhi, IN), P. GHOSH et al.: "An approach to tissue targeting of drugs and proteins using liposomes", pages 12-19, see page 12, abstract	1-5,19	
Y	Methods in Enzymology, vol. 112, 1985, (New York, US), J.L. BOOMER et al.: "[23] Carrier potential of sialoglycans", pages 298-305, see page 298, paragraph 2; page 302, paragraph 2 (cited in the application)	1-5,9, 11	
A	EPA, 0281910B (AMERICAN CYANAMID CO.) 14 September 1988, see page 2, lines 16-18, 32-50		

Learn about [Windows 10](#) **PCs** | [Laptops](#) | [Smartphones](#)

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM THE SECOND SHEET	
<p><input checked="" type="checkbox"/> 1. OBSERVATION WHERE CERTAIN CLAIMS WERE FOUND UNSEARCHABLE</p> <p>The International Search Report did not contain information in respect of certain claims under Article 17(1)(b) of the following reasons:</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> Claim numbers: _____</p> <p>Remarks: _____</p> <p>Reason: Where the claims relate to an <i>in vivo</i> method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> Claim numbers: _____</p> <p>Reason: They relate to parts of the claimed invention that are not amenable to search or examination. That is, they relate to theoretical aspects and are not amenable to search or examination.</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> Claim numbers: _____</p> <p>Reason: They are dependent claims and are not drafted in accordance with the above and were submitted of PCT Rule 14(2).</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> 2. OBSERVATION WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING</p> <p>The International Searching Authority found claims inconsistent in the International application as follows:</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> As all subsequent additional claims were inventively disclosed by the applicant, the International search report omits a description of the International application.</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> As many parts of the required additional search were inventively disclosed by the applicant, the International search report omits only those claims of the International application for which there were not, specifically claimed.</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> No further International search was done except by the applicant. Consequently, the International search report is restricted to the content of the International application of the priority date of the priority claim.</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> As all subsequent claims were inventively disclosed by the applicant, no International search Authority did not draw attention to any other priority date.</p> <p>Summary: Priority</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> The International search has been implemented by applicant's priority.</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> The priority application is the parent of applicant's priority.</p>	

Patent document used in search report	Publication date*	Patent family members	Publication date
WO-A- 9001295	22-02-90	EP-A- 0381742 JP-T- 4501218	15-08-89 05-03-92
EP-A- 0281809	14-09-88	US-A- 4857505 AU-B- 603189 AU-A- 1277688 JP-A- 63253030 ZA-A- 8801657	15-08-89 08-11-90 08-09-88 20-10-88 04-09-88

フロントページの続き

(72)発明者 ジャン、チュー
アメリカ合衆国、マサチューセッツ州
02174、アーリントン、クーリッジ・ロー
ド 21

(72)発明者 ルイス、ジェローム・エム
アメリカ合衆国、マサチューセッツ州
02161、ニュートン、アブランド・アベニ
ュー 273

【公報種別】特許法第17条第1項及び特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第3部門第2区分

【発行日】平成10年(1998)8月18日

【公表番号】特表平6-503347

【公表日】平成6年(1994)4月14日

【年通号数】

【出願番号】特願平4-503177

【国際特許分類第6版】

A61K 47/48

【F1】

A61K 47/48 Z

手 税 相 正 書

平成10年 2月17日

特許庁長官 聲

1 事件の表示
平成4年特許第503177号2 補正をする者
事件との関係 岩井出願人
名 称 アドバンスド・マギキティクス・インク3 代 人
住 所 東京都千代田区永田町1丁目1番28号
相次永田町ビルディング8階
電話 3581-9671
氏 名 (1101) 井理士 山 進 行
司 所
氏 名 (1603) 井理士 木 村 雄4 指定権利通知の日付
平成 年 月 日(発送日)5 指定対象書類名
明細書及び請求の範囲6 補正対象項目名
明細書及び請求の範囲7 補正の内容
岩井のとおり。

- 明細書、6頁2行、5行「インチナリゼーション」を「インターナリゼーション」に訂正する。
- 同、同頁5乃至6行「特定の細胞集団に組合内に」を「細胞の特定の細胞集団に」に訂正する。
- 同、同頁5乃至6行「治療薬は、…を含む。」を「治療薬は既を含むする組成物を含み、多糖類はアラビノガラクタンであり得る。」に訂正する。
- 同、同頁13行「使用する。」を「使用される。」に訂正する。
- 同、8頁9行、11行「でりばりー」を「デリバリー」に訂正する。
- 同、13頁下から6行「ターゲティングされた」を「ターゲティングされる」に訂正する。
- 同、15頁11行「Inferon」を「インフェロン」に訂正する。
- 同、18頁10行「ヒタミン」を「ビタミン」に訂正する。
- 同、19頁16行「凝塊」を「凝塊」に訂正する。
- 同、20頁下から4行「以降」を「以降」に訂正する。
- 同、請求の範囲を以下の通り訂正する。
 - (i) 治療薬と、細胞受容体と併用作用できる多糖類との複合体を生成する工程及び
 - その複合体をインターナリゼーションにより特定の細胞集団に取り込ませる工程
 を含む、特定の細胞集団に治療薬をターゲティングする方法。
 - 分解又は蒸留の前に、多糖類は、1,000ダルトンより大きい分子量を有する、請求項1に記載の方法。
 - 工程(i)が、
 - 第一の多糖類を対象、細胞受容体と併用作用できる第二の多糖類を構成する、第一の多糖類の複合物質を生成する工程及び
 - 治療薬と第二の多糖類の複合体を生成する工程
 を含む、請求項1に記載の方法。
 - 工程(a)において、第一の多糖類の複合物質を生成する工程が、細胞受容体と併用作用することができる第二の多糖類を構成する、第一の多糖類の分

解生成物を生成する工包を含む、請求項3に記載の方法。

5. 多糖類が、アラビノガラクトン、マンナン及びコイダンから成る群から選ばれる、請求項1に記載の方法。

6. 治療薬が、核酸を含む群成物を含み、多糖類がアラビノガラクトンである、請求項5に記載の方法。

7. 治療薬がメトトレキセートを含み、多糖類がアラビノガラクトンである、請求項5に記載の方法。

8. 治療薬が核酸を含み、多糖類がアラビノガラクトンである、請求項5に記載の方法。

9. 治療薬がスpongゴアデノシン (Ara A) 関連物を含み、多糖類がアラビノガラクトンである、請求項5に記載の方法。

10. 治療薬が6- α -メチルブレドニゾロンを含み、多糖類がアラビノガラクトンである、請求項5に記載の方法。

11. 治療薬がトリフルオロチミジンを含み、多糖類がアラビノガラクトンである、請求項5に記載の方法。

12. 治療薬がホルモンを含む、請求項1に記載の方法。

13. ホルモンがコルチコステロイドである、請求項12に記載の方法。

14. ホルモンが6- α -メチルブレドニゾロンである、請求項12に記載の方法。

15. 治療薬が過伝子を含む、請求項1に記載の方法。

16. 治療薬が酵素を含む、請求項1に記載の方法。

17. 治療薬がビタミンを含む、請求項1に記載の方法。

18. ビタミンが葉酸である、請求項17に記載の方法。

19. 治療薬がリボソームを含む、請求項1に記載の方法。

20. 多糖類がアラビノガラクトンである、請求項16に記載の方法。」